

## JP2001302541

Publication Title:

ADJUVANT COMPOSED OF HVJ-CHARGED LIPOSOME

Abstract:

Abstract of JP2001302541

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an adjuvant composed of an HVJ-charged liposome capable of inducing humoral immunity and cellular immunity and inducing high immunoenhancing activity even on a peptide having low immunogenicity. SOLUTION: The present invention relates to an HVJ-charged liposome composed of a lipid having electric charge and Sendai virus (HVJ) as main constituent components, an immune composition produced by sealing an epitope peptide of human immunodeficiency virus in the HVJ-charged liposome and a method for the preparation of the liposome and the composition. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-302541  
(P2001-302541A)

(43) 公開日 平成13年10月31日 (2001. 10. 31)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39		A 6 1 K 39/39	4 C 0 7 6
9/127		9/127	4 C 0 8 4
38/00		39/00	Z 4 C 0 8 5
39/00		39/21	4 H 0 4 5
39/21		C 0 7 K 14/115	
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-128670(P2000-128670)	(71) 出願人	000173555 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(22) 出願日	平成12年4月28日(2000. 4. 28)	(72) 発明者	本多 三男 東京都三鷹市下連雀2-5-11
		(72) 発明者	金田 安史 大阪府箕面市小野原東6-12-8
		(72) 発明者	塩先 巧一 熊本県菊池郡合志町幾久富1866-734
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 HVJ-電荷型リボソームからなるアジュバント

(57) 【要約】

【課題】 液性免疫及び細胞免疫を誘導することができ、且つ免疫原性の低いペプチドに対しても高い免疫増強活性を誘導することができるHVJ-電荷型リボソームからなるアジュバント及びその利用法を提供することにある。

【解決手段】 電荷を有する脂質及びセンダイウイルス(HVJ)を主構成要素とするHVJ-電荷型リボソーム、該HVJ-電荷型リボソームにヒト免疫不全ウイルスのエピトープペプチドを封入した免疫組成物並びにこれらの作製方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】低分子物質に対する液性免疫及び細胞性免疫を誘導し得るアジュバントであって、センダイウイルス(HVJと称することもある)又は該HVJのエンベロープ糖蛋白質、及び脂質成分を主構成要素とするHVJ-電荷型リボソームからなることを特徴とする前記アジュバント。

【請求項2】HVJ-電荷型リボソームが正電荷型であることを特徴とする請求項1記載のアジュバント。

【請求項3】HVJ-電荷型リボソームが負電荷型であることを特徴とする請求項1記載のアジュバント。

【請求項4】脂質成分が、ホスファチジルコリン(PC)、コレステロール(Chol)、ジメチルアミノエタン・カーバミルコレステロール(DC-Chol)ホスファチジルセリン(PS)、スフィンゴミエリン(Sph)、ホスファチジルエタノラミン(DOPE)、(DOTMA)、(TMAG)及び(GAPDLRIE)からなる群より選ばれる請求項1ないし3記載のいずれかのアジュバント。

【請求項5】HVJのエンベロープ糖蛋白質が、F又はHN蛋白質である請求項1ないし4記載のいずれかのアジュバント。

【請求項6】請求項1ないし5記載のいずれかのアジュバントに、任意の抗原物質を含有してなる免疫組成物。

【請求項7】前記抗原物質がHIV感染防御抗原である請求項6記載の免疫組成物。

【請求項8】HIV感染防御抗原がエпитープペプチドである請求項7記載の免疫組成物。

【請求項9】エпитープペプチドが、V3ペプチドである請求項8に記載の免疫組成物。

【請求項10】任意の抗原物質及び脂質成分を用いて、該抗原物質が封入された電荷型リボソームを作製し、該電荷型リボソームにHVJ又は該HVJのエンベロープ糖蛋白質を取り込ませることを特徴とする免疫組成物の作製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、液性免疫及び細胞性免疫を効果的に増強することができる電荷型リボソーム及びその製造方法に関する。更に詳細には、細胞融合作用を有するセンダイウイルス(Hemagglutinating Virus of Japan: HVJと称することもある)及び正・負電荷脂質を含む電荷型リボソーム、該電荷型リボソームに抗原物質を含有させた免疫組成物、及び該組成物の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】感染症の予防や治療に使用されるワクチンの効果を上げるために、免疫応答を増強させるアジュバントやアジュバントに添加される免疫刺激物質が用いられる。これまでに多種のアジュバントが報告されているが、その多くは、毒性を示したり潰瘍を形成するな

ど、ヒトに使用できないものが多い。

【0003】唯一、ヒトに使用可能なアジュバントとして、水酸化アルミニウムやリン酸化アルミニウムゲルなどの吸着型のアジュバントが認められている。しかしながら、このアルミニウムゲルは、抗体産生に係る液性免疫を効果的に誘導するが、細胞性免疫の誘導能は強くない。生態防御には、液性免疫だけでなく細胞性免疫が深く関与しており、免疫不全ウイルス(HIV)などの持続性感染型のウイルス性疾患の予防や治療においては、特に細胞性免疫のコントロールの重要性が指摘されている。また、アルミニウムゲルは、免疫原性が比較的に弱い物質、例えばサイズの小さなペプチドに対して、免疫増強活性が低いという欠点が表示されている。

【0004】近年、このような問題を解消する方法の一つとして、従来、生体膜モデルとして細胞膜構造の研究材料等に広く使用されてきたリボソームが注目されている。リボソームは、膜の流動性や膜透過障壁などの生物学的な現象の解析だけでなく、種々の蛋白抗原、DNA、及びdrugなどの物質を効果的に細胞内に投与する方法として、種々の疾患の治療への応用が求められており、その必要性及び利用技術が追求されてきた。

【0005】例えば、癌細胞表面に存在する抗原提示糖蛋白質をリボソームに再構築したリボソームワクチン(特願平2-188532)、インフルエンザのhemagglutinin(HA)をリボソーム膜に取り込んだピロゾーム型インフルエンザワクチン(Vaccine, Vol.15, pp.1675-1679, 1997)、インフルエンザピロゾームに不活化A型肝炎ウイルス(HAV)を結合させたIRIV-HAVワクチン(J. Clin. Invest Vol.90, 2491-2495, 1992)など、免疫増強活性を賦与したワクチンが報告されている。

【0006】しかしながら、これらのリボソームワクチンに使用された免疫原は、いずれも高分子量の蛋白質分子あるいはウイルス粒子であって、免疫原性の低い物質に対して同様の効果を示すかどうかは明らかにされていない。更に、インフルエンザのHAをリボソームに使用した場合は、ほとんどのヒトがインフルエンザウイルスに対する抗体を有しているので、実質的な効果は半減する可能性がある。

【0007】また、リボソームにアジュバント活性を有する物質を含有させることにより免疫増強活性を高める試みがなされている。例えば、PCT公開公報(WO 9640243)には、免疫増強活性やインターフェロン誘導活性を有するリボ多糖(例えば、グラム陰性菌の細胞壁外膜に存在する内毒素であるリピドA)をリボソームに再構築し、これにHIVのgp120エпитープを添加したリボソームは、gp120に対する液性免疫及び細胞性免疫を誘導することが記載されている。しかしながら、リピドAは、バイロジェンの本体であり、発熱や炎症を起こすことが危惧されるため、ヒトへの使用に際しては、慎重な取り扱いを要する。

【0008】また、リボソームは、使用する脂質により、その形状やサイズ、安定性、保有できる物質の大きさや量などに大きく影響を受けることやリボソームの極性によって細胞膜に対する親和性や物質の膜透過性に差異を生じることが知られている（油化学 第34巻第10号 p784-798, 1985）。したがって、リボソームを作製するには、目的に応じて脂質を使い分けることが重要と考えられる。

【0009】HVJは、シアル酸のついた糖脂質、糖蛋白質（F：フュージョン、HN：ヘモアグルチニン-ノイラミニダーゼの2種類の糖蛋白が知られている）からなるエンベロープを有し、リンパ球以外のほとんどの細胞に融合することができる。HVJの細胞融合作用が発見されて以来、HVJを利用した物質の細胞内導入法に関する研究が盛んに行われ、HVJを用いた酵素の細胞内導入、赤血球ゴーストとHVJを用いた抗体や核蛋白質の導入、リボソーム表面にHVJの融合蛋白質を植え込んだ融合リボソーム（以下、HVJ-リボソームと称することもある）による毒素の導入など、多くの報告が見られる。特に、HVJ-リボソームは、蛋白質や核酸断片などの物質を細胞内に効率良く導入することができ、細胞毒性も少ないことから、最近では、遺伝子の細胞内導入法として注目され、遺伝子治療への応用が期待されている（Biogenic Amines, Vol.14, pp.553-572, 1998, MOLECULAR MEDICINE TODAY, JULY 1999 (VOL.5), P298-303, 化学と生物 Vol.36, No6, p376-384, 1988）。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】上述したように、HVJ-リボソームを用いた物質の効率的な細胞内導入法は、既に幾つか試みられているものの、HVJ-リボソームのアジュバント活性に係る研究成果は、これまでほとんど報告されていない。有効性や安全性の点から実用に耐え得るアジュバントは、現時点ではアルミニウムゲル以外にはなく、これに代わり得るアルミニウムゲルの持つ欠点を克服した、より実用的で効果的なアジュバントの開発が望まれている。

【0011】このような状況下、本願発明は、液性免疫及び細胞免疫を誘導することができ、且つ免疫原性の低いペプチドに対しても高い免疫増強活性を誘導することができるHVJ-電荷型リボソーム及びその作製方法を提供することを目的とするものである。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、HIVのエピトープペプチドを取り込んだHVJ-電荷型リボソームは、これまで抗原性が低くてワクチンとして使用することが困難と考えられていたHIV抗原性を有意に効果的に高めること及びHVJ-電荷型リボソームは強力なブースター（booster）効果を有することを見出し、本願発明を完成するに至った。

【0013】したがって、本願発明は、HVJ-電荷型リボソーム、HIVエピトープペプチドを取り込んだHVJ-電荷型リボソームを主成分とするワクチン及びこれらの製造方法を包含する。

#### 【0014】

【発明の実施の形態】本願発明は、HVJのエンベロープ糖蛋白質（F, HN）を電荷型リボソームに再構築したHVJ-電荷型リボソーム及び該リボソームに感染防御抗原を取り込んだ組成物によって特徴付けられる。この組成物を対象動物又はヒトに投与することにより、感染防御抗原に対する高い免疫を賦与することができる。

【0015】正電荷型リボソームは、局所への対流性が優れていて、局所の細胞と融合しやすいのでboosterとしての局所免疫に優れている。一方、負電荷型リボソームは、細胞膜と反発しやすいので、全身にばらまかれて全身のリンパ系組織に取り込まれやすい。したがって、目的と免疫スケジュールに合わせて、正電荷型か負電荷型かを選ぶことにより、より効果的に免疫作用を誘導することができる。例えば、局所の粘膜免疫の誘導には正電荷型の使用がより有効であるし、遅延型過敏反応（DTH）の誘導にも正電荷型が有効である。これに対して、boosterとして皮下投与して全身免疫を誘導する際には、負電荷型の使用が効果的である。

【0016】リボソームの粒子は、上記の免疫増強の目的に応じて、組成を変えることによりリボソーム電荷を自由に賦与することができる。本願発明のHVJ-電荷型リボソームの作製に使用される脂質成分としては、ホスファチジルコリン（phosphatidylcholine: PC）、ホスファチジルセリン（phosphatidylserine: PS）、コレステロール（cholesterol: Chol）、ジメチルアミノエタン・カーバミルコレステロール（dimethylaminoethane-carbamoyl cholesterol: DC-chol）、ホスファジチルエタノラミン（dioleoylphosphatidylethanolamine: DOP E）、スフィンゴミエリン（sphingomyelin: Sph）、ジオレイルオキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド（N-{1-(2,3-dioleoyloxy)propyl}-r,n,n-trimethyl ammonium chloride: DOTMA）、トリメチルアンモニオアセチルジドデシルグルタメートクロライド（N-( $\alpha$ -trimethyl ammonioacetyl) didodecyl-D-glutamate chloride: TMAG）、アミノプロピルジメチルジドデシルオキシプロパニウムブロマイド（N-(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(dodecyloxy)-1-propanaminium bromide: GAPDLRIE）などが挙げられる。これら脂質成分の組み合わせにより、電荷の程度が異なる種々の正電荷型リボソーム又は負電荷型リボソームを作製することができる。

【0017】正電荷型リボソームを作製するには、好ましくは、DC-Chol、PC、Sph、DOPE及びCholよりなる組成物が使用される。負電荷型リボソームを作製する際には、PS、PC、Sph、DOPE及びCholよりなる組成物を使用

するのが好ましい。各脂質成分の量比は、リボソームの形状やサイズ及び使用目的に応じて変更される。例えば、低分子量の物質を封入するための正電荷型リボソームを作製する場合には、DC-Chol:PC:Chol=6:48:24 (重量比) で使用可能であるが、好ましくは、DC-Chol:PC:Sph:DOPE:Chol=6:13:12:12:24 (重量比) が使用される。負電荷型リボソームの作製は、PS:PC:Chol=10:48:24 (重量比) で可能であるが、好ましくは、PS:PC:Sph:DOPE:Chol=10:13:12:12:24 (重量比) が使用される。

【0018】HVJ-電荷型リボソームの作製には、精製したHVJのウイルス粒子及び該ウイルス粒子から抽出・精製した糖蛋白質 (F, HN) のいずれも使用可能であるが、好ましくは、ウイルス粒子が使用される。HVJの精製は、該ウイルス感染細胞の培養液から、一般的なウイルス精製方法、すなわち、遠心分離、膜ろ過及びイオン交換クロマトグラフィーなどの方法又はこれらを組み合わせる方法により行われる。

【0019】該ウイルスを不活化する際には、紫外線照射による方法やbeta-propyolactoneなどの化学物質を用いる方法が使用される。また、HVJエンベロープ蛋白質の抽出・精製は、界面活性剤、例えばNP-40、Triton X-100、octylglucosideなどで膜蛋白質を抽出した後、蛋白質化学において通常使用される精製方法、例えば、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法などを適宜利用することにより達成される。

【0020】HVJ-電荷型リボソームには、ウイルス粒子、抗原蛋白質及びペプチドなどの抗原物質、抗生物質やアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの医薬品、細胞内や生体内で発現する様に構築された核酸断片など、種々の物質を封入することができる。本願発明のHVJ-リボソームは、抗原物質のアジュバント活性を高めるのに特に有用である。この際使用する抗原物質は、目的のエピトープを有する免疫物質であるならばどのようなものも使用でき、抗原性の強さに制限されない。このような抗原物質として、例えば、免疫不全ウイルスに対するエピトープを有するペプチドが挙げられ、遺伝子組換え技術又は化学合成により作製されたものを使用することができる。

【0021】HIV-電荷型リボソームに封入する物質の量は、物質の種類、形状、サイズ及び目的に応じて適宜選択される。例えば、抗原物質の量は、抗原の種類やリボソームの組成・構造等により異なるが、一般にリボソームを構成する脂質 9.75 mg当り、0~10 mgの範囲で使用される (例えば、溶媒200~500 µlに溶解可能な量であれば、10~60%の率で封入可能)。

【0022】本願発明のHVJ-電荷型リボソームは、金田らの方法 (Saeki, Y., & Kaneda, Y.: Protein modified liposomes (HIV-liposomes) for the delivery of genes, oligonucleotides and proteins. Cell Biology; A

laboratory handbook (2<sup>nd</sup> eds.) edited by J.E.Celis (Academic Press Inc., San Diego) vol4, 127-135, 1998.) に従って調製される。すなわち、所定の脂質を溶剤に溶解した後、エバポレーターなどにより該溶剤を蒸発除去し、脂質の薄膜を形成させる。このとき使用される溶剤として、クロロホルム、ジエチルエーテル、テトラヒドロフランなどが挙げられ、単独又は数種を混合して使用することができる。好ましくは、クロロホルムが使用される。

【0023】次に、この脂質の薄膜に水溶性媒体を加えて激しくボルテックス振盪し、電荷型リボソームを形成させる。水溶性媒体として、BBS (ホウ酸緩衝液)、PBS (リン酸緩衝液)、生理食塩水、水などが使用可能であるが、好ましくは、BBS、PBSが使用される。水溶性媒体のpHは、7~8の範囲で使用できるが、好ましくは、pH 7.5が使用される。

【0024】水溶性媒体中に、目的物質を溶解又は懸濁させておくことにより、該目的物質を電荷型リボソームに封入することができる。このようにして得られる電荷型リボソームの無菌処理は、0.2~0.45 µmのフィルターを通すことにより行われる。本発明のHVJ-電荷型リボソームは、多重層型又は単層型のいずれの型であってもよく、これらは、ボルテックス法、超音波法、エタノール注入法、エーテル法及び逆相蒸発法などを適宜選択又は組み合わせることにより調製される。

【0025】次に、電荷型リボソームにHVJ粒子又はHVJのエンベロープ糖蛋白質が導入される。例えば、上記リボソーム液に、紫外線照射して不活化したHVJを加え、氷上10分間放置した後、37°Cの恒温槽に移し、振盪することにより、HVJが電荷型リボソーム表面に結合したHVJ-電荷型リボソームを形成させることができる。HVJ-電荷型リボソームは、密度勾配遠心を行うことにより未反応成分から分離・精製される。

【0026】種々の感染防御抗原、その他の免疫抗原を封入したHVJ-電荷型リボソームは、単独又は薬剤として投与可能な適当な安定剤と共に、生体内に投与することによりワクチンとして使用される。また、本願発明のHVJ-電荷型リボソームは、通常のリボソームと同様に、本願発明のHVJ-電荷型リボソームに抗生物質や核酸断片などの目的物質を封入することにより、物質の細胞内への取りこみを促進させる補助剤として利用することもできる。

【0027】

【発明の効果】本願発明によると、アジュバント活性を有するHVJ-電荷型リボソームが提供される。

【0028】免疫原物質を封入した本願発明のHVJ-電荷型リボソームは、強力なアジュバント活性を有するため、抗原性の低いペプチドに対しても高い免疫を誘導することができる。また、HVJ-電荷型リボソームは、液性及び細胞性免疫を増強させるbooster効果を有する。

更に、本願発明の方法により容易に調製される極性の異なる電荷型リボソームは、ドラッグデリバリーシステムとして効果的に利用でき、且つHVJの細胞融合作用を有するために、目的物質を効率良く細胞内に取り込ませることができる。

【0029】

【実施例】実施例1：HIV-V3ペプチドを含むHVJ-正電荷型リボソームの作製

DC-Chol (日本油脂より供与) 6mg、DOPE (Sigma P5078) 12mg、Sph (Sigma S0756) 12mg、egg yolk PC (Sigma P2772) 13 mg、Chol (Sigma C8667) 24 mgをクロロホルム (Nakarai) 4 mlに溶解させ、これを0.5 mlずつ、尖頭ガラス管 (13cm長、Iwaki Glass) 8本に分注し、窒素ガスを吹き込んで密栓し、 $-20^{\circ}\text{C}$ に一時保存した。ガラス管を1本ずつ取り出し、回転式エバポレーター (Tokyo Rikakikai) に取り付け、クロロホルムを蒸発させながら、ガラス管内壁に混合脂質の薄膜を形成させ、窒素ガスを吹き込んで密栓し、 $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。ガラス管1本に300  $\mu\text{l}$ のHIV-V3ペプチド (1 mg) 溶液 (PBS) を加え、50秒間、激しくボルテックス振盪し、10秒間 $37^{\circ}\text{C}$ に保温した。これを8回繰り返した。BSS (10 mM Tris-HCl pH7.5, 137 mM NaCl, 54 mM KCl) 700  $\mu\text{l}$ を加え、セルロースアセテートフィルター (Iwaki Glass) 0.45  $\mu\text{m}$ 径を通し、さらに500  $\mu\text{l}$  BSSでフィルターを洗浄し、次にリボソーム液を0.20  $\mu\text{m}$ 径の同フィルターを通し、再び500  $\mu\text{l}$  BSSでフィルターを洗浄した。

【0030】HVJを漿尿液より精製しておき、このウイルス液20,000 HAU (Hemagglutinating Unit) を紫外線照射 (198 mJoule/cm<sup>2</sup>) して不活化し、これをリボソーム液に加え、氷上10分間置き、 $37^{\circ}\text{C}$ の恒温槽に移し、1時間振盪 (毎秒2回転) した。30%蔗糖含有BSS (W/V) 7 mlを遠心チューブに入れ、その上にHVJ-リボソーム液を重ねし、スイング型超遠心機 (日立 CP85beta) にて、62,800 g、90分間超遠心した。30%蔗糖液の直上のHVJ-リボソーム層をパスツールピペットで回収し、 $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0031】実施例2：HIV-V3ペプチド含むHVJ-負電荷型リボソームの作製

PS 10mg、DOPE (Sigma P5078) 12 mg、Sph (Sigma S0756) 12mg、egg yolk PC (Sigma P2772) 13mg、Chol (Sigma C8667) 24mgをクロロホルム (Nakarai) 4 mlに溶解させ、これを0.5 mlずつ、尖頭ガラス管 (13 cm長、Iwaki Glass) 8本に分注し、窒素ガスを吹き込んで密栓し、 $-20^{\circ}\text{C}$ に一時保存した。ガラス管を1本ずつ取り出

し、回転式エバポレーター (Tokyo Rikakikai) に取り付け、クロロホルムを蒸発させながら、ガラス管内壁に混合脂質の薄膜を形成させ、窒素ガスを吹き込んで密栓し、 $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。ガラス管1本に200  $\mu\text{l}$ のHIV-V3ペプチド (1 mg) 溶液 (PBS) を加え、30秒間、激しくボルテックス振盪し、30秒間 $37^{\circ}\text{C}$ に保温した。これを8回繰り返した。湯浴型超音波発生装置で3秒間超音波処理し、30秒間ボルテックスで激しく振盪し、300  $\mu\text{l}$  BSSを加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で30分間振盪 (毎秒2回転) させた。

【0032】HVJを漿尿液より精製しておき、このウイルス液20,000 HAU (Hemagglutinating Unit) を紫外線照射 (198 mJoule/cm<sup>2</sup>) して不活化し、これをリボソーム液に加え、氷上10分間置き、 $37^{\circ}\text{C}$ の恒温槽に移し、1時間振盪 (毎秒2回転) した。30%蔗糖含有BSS (W/V) 7 mlを遠心チューブに入れ、その上にHVJ-リボソーム液を重ねし、スイング型超遠心機 (日立 CP85beta) にて、62,800 g、90分間超遠心した。30%蔗糖液の直上のHVJ-リボソーム層をパスツールピペットで回収し、これを4倍量のBSSで希釈し、遠心管に入れ、27,000 g、30分間、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心し、HVJ-リボソームを沈殿させ、これに300  $\mu\text{l}$ のPBSを加え、ボルテックスで懸濁し、 $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0033】実施例3：電荷型リボソームのブースター効果

(1) 局所皮膚反応の誘導

B型肝炎ウイルスコア蛋白 (HBc) 遺伝子をキャリアとして、これにHIV-1<sub>HXB2</sub>又はHIV-1<sub>MN</sub> env V3-PND (主要中和領域) 遺伝子を挿入し、HIV-HBsキメラ粒子を作製した (作製方法は、特許番号第2717799号に記載されている)。モルモット (ハートレー種) を、フロイント完全アジュバント (CFA) に懸濁したHIV-HBc (HIV-HBc/CF A)、生理食塩水に懸濁したHIV-HBc (HIV-HBc/PBS)、生理食塩水に懸濁したHBc (HBc/PBS) 又はHIV-1 PNDペプチド (HIV/PBS) で、2週間の間隔で2回免疫した。7日後に、それぞれのグループのモルモットにカプトガン血球凝集素 (KLH) とHIVenvV3ドメインの主要中和領域 (PND) ペプチドとのコンジュゲート、又はHBc粒子、又はPBSを皮下注射して、皮膚反応を見た。局所の皮膚反応は抗原接種の24時間後に測定した。その結果を表1に示す (数値は、各グループ (8匹) の平均値を示す)。HBc抗原に対してのみ特異的皮膚反応を呈した。

【0034】

【表1】

グループ	免疫物質	チャレンジ抗原	抗原量 ( $\mu$ g/局所)	局所DTH反応 発多径(mm)
1	HV HB/CEA	ENDペプチド HB粒子 EES	10 01 —	2x1 93x86 1x2
2	HV HB/EES	ENDペプチド HB粒子 EES	10 01 —	0x0 145x140 0x0
3	HB/EES	ENDペプチド HB粒子 EES	10 01 —	0x0 154x148 1x1
4	HV/EES	ENDペプチド HB粒子 EES	10 01 —	0x0 1x1 1x1
5	EES	ENDペプチド HB粒子 EES	10 01 —	1x2 2x2 1x2

【0035】次に、モルモットをHIV-HBcでプライミングし、その2週後に種々のHVJ-HIV-リボソームでブースターをかけた。上記と同様の方法に従い、局所の皮膚反応を測定した。その結果を表2に示す(数値は、各グループ(8匹)の平均値を示す)。HIVリボソームにHVJを取りこませることにより、HIV特異的遅延型皮膚反応が

誘導された。その中でも局所のDTH反応においては、cationicなりボソームに比べてanionicなりボソームの方が効率が良かった。

【0036】

【表2】

グループ	プライミング抗原	ブースター抗原	チャレンジ抗原	抗原量 ( $\mu$ g/局所)	局所DTH反応 発疹の径 (mm)
1	HIV- HBc/PB S	HVJ-HIV-リ ボソーム (anionic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	22.5x24.8 20.5x18.5 2x1
2	HIV- HBc/PB S	HIV-リボソーム (anionic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	3x3 20.5x21.0 1x0
3	HIV- HBc/PB S	HVJ-HIV-リ ボソーム (cationic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	13.4x14.1 19.3x17.5 0x0
4	HIV- HBc/PB S	HIV-リボソーム (cationic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	2.2x2.7 16.5x18.0 0x0
5	HBc/PB S	HVJ-HIV-リ ボソーム (anionic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	2x3 6.3x7.2 1x0
6	HBc/PB S	HIV-リボソーム (anionic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	2x3 9.5x11.0 0x0
7	PBS	HVJ-HIV-リ ボソーム (anionic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	0x0 2x1 2x2
8	PBS	HIV-リボソーム (anionic)	PNDペプチ ド HBc 粒子 PBS	10 0.1 —	2x2 1x1 0x0

【0037】(2) 抗体産生の誘導  
 モルモット(ハートレー種)を、CFAに懸濁したHIV-HBc  
 (HIV-HBc/CFA)、生理食塩水に懸濁したHIV-HBc (HIV-  
 HBc/PBS)、生理食塩水に懸濁したHBc (HBc/PBS) 又はH  
 IV-1 PNDペプチド (HIV/PBS) で、2週間の間隔で2回免  
 疫した。初回免疫の6週後に採血し、血清中のHIV-1抗

体及びHBc抗体を測定した。抗体力価は、血清の限界希  
 釈によるELISA法で算出した(数値は、4回の異なるア  
 ッセイの平均値を示す)。HBc抗原に対する特異的抗体  
 が検出された。

【0038】

【表3】

グループ	免疫物質	HIV-1 抗体限界濃度	HBc 抗体限界濃度
1	HIV- HBc/CFA	<10	1150
2	HIV- HBc/PBS	<10	740
3	HBc/PBS	<10	870
4	HIV/PBS	<10	<10
5	PBS	<10	<10

【0039】次に、モルモットをHIV-HBcでプライミン  
 グし、その2週後に種々のHVJ-HIV-リボソームでブース

ターをかけた。初回免疫の6週後に採血し、血清中のHI  
 V-1抗体及びHBc抗体を測定した。その結果を図1に示



す。抗体価は、上記と同様の方法で算出した（数値は、4回の異なるアッセイの平均値を示す）。中和活性は、GHOST-cell1アッセイ法による阻止効果（コントロールに対する％）で表した（数値は、4回の測定の前平均値を示す）。HVJ-HIV-リボソームでブーストしたモルモットから得たIgGは、10～15μl/mlでHIV-1LAIを50％中和した。

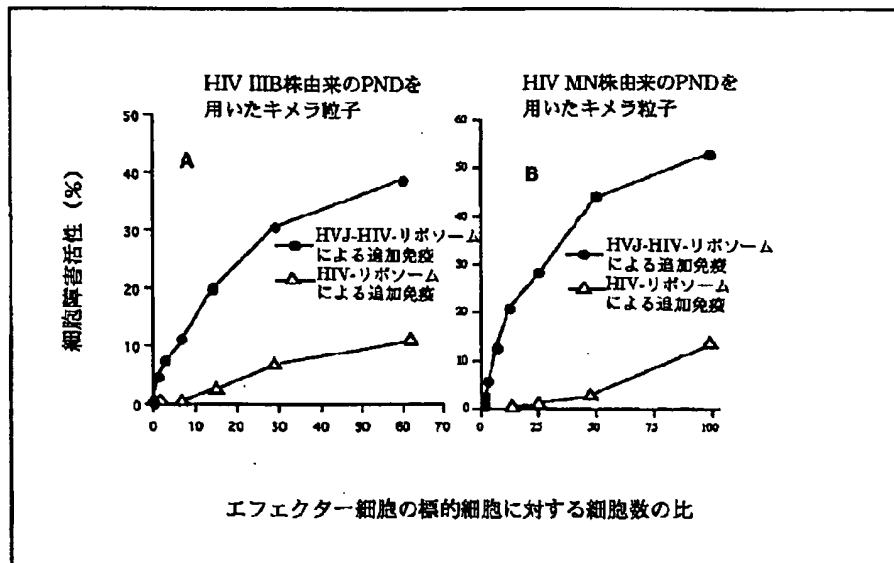
#### 【0040】(3) CTLの誘導

HIV-HBcキメラ粒子を免疫した後、3週目にHIV-HVJ-リボソームを追加免疫した。追加免疫1週目のCTL活性を図2に示した。CTLの活性測定は通常の51Crクロームリリースアッセイにより測定された。Aが標的細胞にHIVのIIIB株由来のPNDペプチドをパルスラベルした場合で、Bが標的細胞にHIVのMN株由来のPNDペプチドをパルスラベルした場合の成績である。いずれの場合でもHIVリボソームにHVJを取り込ませることにより、CTL誘導活性が飛躍的に向上した。本免疫に使用されたマウスにおいては、体重増加の結果も含めて臨床上的異常は見られなかった。この結果は、CTL誘導のアジュバント活性がHIV-HVJ-リボソームにあり、その有効成分としてHVJ取り込みがその効率に大きく寄与していることを示している。

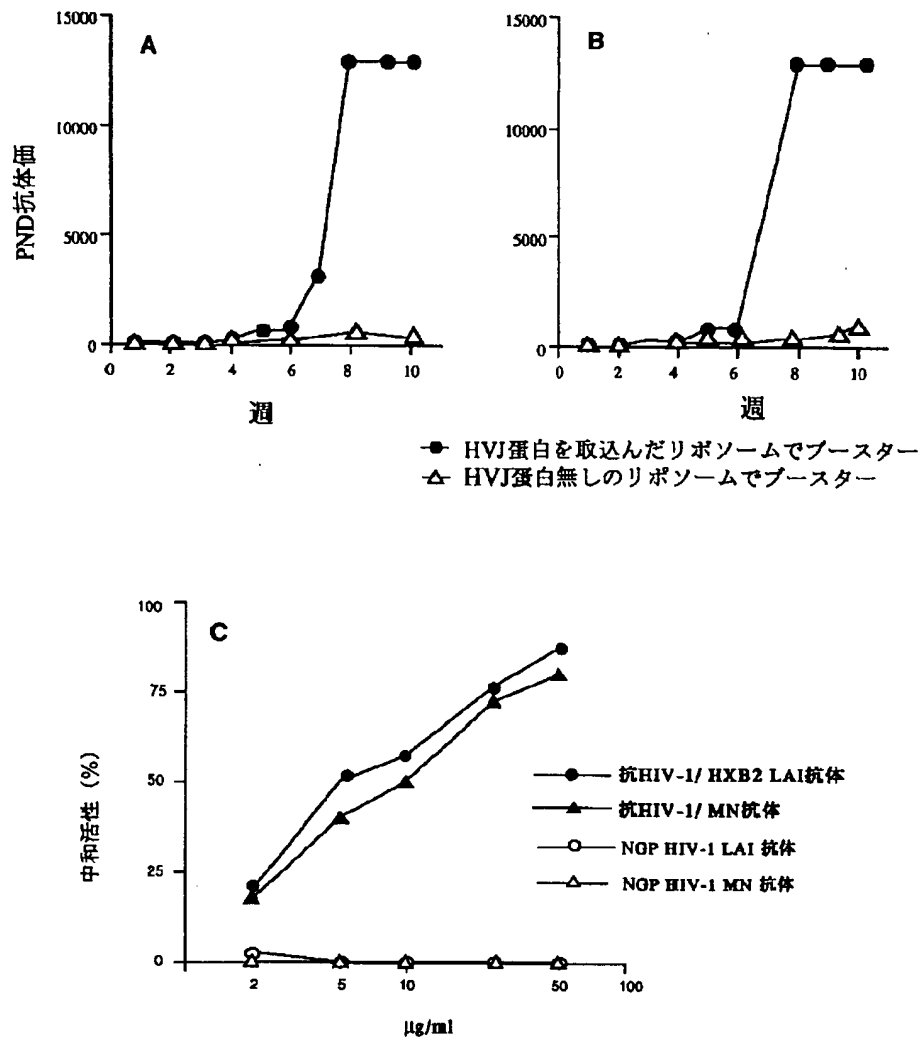
【図面の簡単な説明】  
【図1】Aは、HIV IIIB株（LAI株と同じ）のPND領域のペプチドに対するELISA抗体価を測定した結果を示す図である。Bは、HIV MN株のPND領域のペプチドに対するELISA抗体価を測定した結果を示す図である。Cは、上記抗体の中和活性を測定した結果を示す図である。

【図2】Aは、HIVのIIIB株のPNDを有するHIV-HBcキメラ粒子で基礎免疫をしたマウスに、IIIB株のPND由来のHVJ-HIV-1HXB22の環状V3ペプチドを含むリボソームで追加免疫をしたときに観察されるHIV-1特異的なCTL活性の測定結果を示す図である。Bは、HIVのMN株のPNDを有するHIV-HBcキメラ粒子で基礎免疫をしたマウスに、IIIB株のPND由来のHVJ-HIV-1HXB22の環状V3ペプチドを含むリボソームで追加免疫をしたときに観察されるHIV-1特異的なCTL活性の測定結果を示す図である。

【図2】



【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

C 0 7 K 14/115

識別記号

F I

A 6 1 K 37/02

特許請求の範囲 (参考)

F ターム(参考) 4C076 AA19 BB11 CC06 EE41 EE51  
 EE56  
 4C084 AA02 AA03 BA44 CA01 NA05  
 NA14 ZB022 ZB092 ZB262  
 ZC552  
 4C085 AA02 AA38 BA69 CC08 CC21  
 CC32 FF19  
 4H045 AA11 AA30 BA53 CA01 CA05  
 DA86 EA31